

Juliana Laurentino Burger

**EFEITO DOS METAIS PESADOS CHUMBO E MANGANÊS NA
MORFOFISIOLOGIA DA MACROALGA VERMELHA
*PTEROCLADIELLA CAPILLACEA***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina, como parte das exigências
para a obtenção do título de Licenciado
em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Éder Carlos Schmidt
Co-orientadora: Débora Tomazi Pereira

Florianópolis – SC

2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Burger, Juliana Laurentino
EFEITO DOS METAIS PESADOS CHUMBO E MANGANÊS NA
MORFOFISIOLOGIA DA MACROALGA VERMELHA PTEROCLADIELLA
CAPILLACEA / Juliana Laurentino Burger ; orientador, Eder
Carlos Schmidt ; coorientador, Débora Tomazi Pereira. -
Florianópolis, SC, 2015.
69 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. Toxicologia. 3. Metais
Pesados. I. Schmidt , Eder Carlos. II. Pereira, Débora
Tomazi . III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

**EFEITO DOS METAIS PESADOS CHUMBO E MANGANÊS NA
MORFOFISIOLOGIA DA MACROALGA VERMELHA
*PTEROCLADIELLA CAPILLACEA***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Santa Catarina, como parte das exigências
para a obtenção do título de Licenciado
em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Éder Carlos Schmidt (Dr.)

Presidente da Banca – Orientador

Luciane Cristina Ouriques (Dra.)

Membro

Fernanda Ramlov (Dra.)

Membro

Débora Tomazi Pereira

Membro suplente – Co-orientadora

Florianópolis, 1 de dezembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo carinho e dedicação, as minhas irmãs pelos conselhos e auxílios ao longo da minha graduação e a minha sobrinha Lilith que alegrou meus dias durante a construção deste trabalho. **MUITO OBRIGADA** por acreditarem nos meus sonhos, por serem esta família maravilhosa e por me tornarem uma pessoa melhor a cada dia.

Ao meu orientador Éder, pela paciência, dedicação e risadas ao longo de todo este trabalho. Se não fosse pelo seu apoio eu não chegaria onde estou hoje. **MUITO OBRIGADA** pelos aprendizados e por ter acreditado em mim.

A todos os colegas do LABCEV que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, além das risadas e conversas motivadoras durante o ano. Em especial, queria agradecer a minha colega e co-orientadora Débora, por toda paciência, auxílio nos experimentos e transmissão de conhecimento.

Aos colegas de graduação, tanto os da UFSC, quanto os da Universidade de Coimbra, que fizeram estes anos os melhores da minha vida. Obrigada pela amizade, momentos inesquecíveis, risadas, parcerias de viagem e por tornarem a graduação mais leve e com aprendizados não só acadêmicos, mas para a vida.

E aos demais amigos, que fizeram parte da minha vida durante todos os anos de faculdade, me dando conselhos, me fazendo sorrir, me abraçando fortemente e apoiando as minhas decisões. **OBRIGADA!**

RESUMO

A toxicidade dos metais pesados em ambientes aquáticos vem crescendo a cada dia e o excesso destes elementos impacta negativamente as macroalgas marinhas e os organismos com a qual interagem. Desta forma, foram analisados no presente estudo, os efeitos de exposição aos metais pesados Chumbo (Pb) e Manganês (Mn) sobre a macroalga vermelha *Pterocladia capillacea*, com concentrações de 15, 30, 45 e 60 ppm, durante 7 dias. Os efeitos dos metais pesados Pb e Mn na macroalga foram avaliados através da morfologia, taxa de crescimento, ensaio de MTT, concentração de pigmentos acessórios e clorofila *a*, quantidade de carotenoides, fenólicos e flavonoides, açúcar e amido, bem como análise de microscopia de luz. Como resultados as algas expostas ao metal Pb, apresentaram despigmentação dos segmentos apicais, redução na quantidade de clorofila *a* e diminuição da substância de reserva amido. Nas algas expostas ao metal Mn, foram observadas pigmentação inalterada, aumento nas taxas de crescimento e na quantidade de clorofila *a*. Em ambos os tratamentos foi verificada uma diminuição na taxa de viabilidade celular, redução na quantidade de pigmentos acessórios, carotenoides, fenólicos, flavonoides e açúcares. Não foi observada alterações significativas na parede celular de acordo com as imagens de microscopia de luz. Os resultados obtidos indicam que os metais pesados Chumbo e Manganês afetaram negativamente a morfologia, a fisiologia e a bioquímica de *P. capillacea*, no entanto o efeito do chumbo foi mais drástico e invasivo em comparação ao metal manganês.

Palavras-chave: *Pterocladia capillacea*, metais pesados, chumbo, manganês, morfologia, fisiologia, microscopia de luz.

ABSTRACT

The toxicity of heavy metals in aquatic environments is growing every day and the excess of these elements adversely affects marine macroalgae and the organisms with which they interact. Thus, were analyzed in this study, the effects of the exposure to the heavy metals lead (Pb) and manganese (Mn) on the red macroalgae *Pterocladia capillacea* with concentrations of 15, 30, 45 and 60ppm for 7 days. The effects of the heavy metals Pb and Mn in the macroalgae were evaluated by morphology, growth rate, MTT assay, accessory pigments concentration and chlorophyll a, number of carotenoids, phenolics, and flavonoids, sugar and starch, as well as microscopy light analysis. The results obtained from algae exposed to Pb metal, showed depigmentation of the apical segments, reduction in growth rate, reduction in the amount of chlorophyll a, reduction of total sugars and starch reserve substance. In the algae exposed to Mn metal was observed unchanged pigmentation, increase in growth rates and the amount of chlorophyll. In both treatments was observed a decrease in cell viability rate, reduction in number of accessory pigments, carotenoids, phenolic compounds, flavonoids and sugars, while no significant changes in the cell wall of the algae according to the microscopy light images. The results indicate that the heavy metals Lead and Manganese adversely affect the morphology, physiology and biochemistry *P. capillacea*, however, the effect of lead is more drastic and invasive in comparison to metal manganese.

Key words: *Pterocladia capillacea*, heavy metals, lead, manganese, morphology, physiology, light microscopy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Espécime de *P. capillacea*.....16
- Figura 2** - Local de coleta da *Pterocliadiella Capillacea*. A. Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. B. Praia da Armação. C. Vista do local onde foram coletados os exemplares da macroalga. Fonte: Giulia Burle Costa com adaptações....26
- Figura 3** - Desenho esquemático dos nove grupos experimentais utilizados no presente estudo.....28
- Figura 4** - Morfologia dos segmentos apicais de *P. capillacea* após 7 dias de cultivo. A. Controle. B-C-D-E. Amostras expostas ao metal Chumbo com concentrações de 15, 30, 45 e 60ppm respectivamente. F-G-H-I. Amostras expostas ao metal Manganês com concentrações de 15, 30, 45 e 60ppm respectivamente.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5** - Taxas de Crescimento das amostras de *P. capillacea* após 7 dias de experimento ($n = 6$; média \pm DP). As diferentes letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste unifatorial ANOVA e o teste de Tukey ($p \leq 0.05$)...**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6** - Ensaio MTT das amostras de *P. capillacea* após 7 dias de cultivo ($n = 6$; média \pm

DP).....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 7 - Concentrações de carotenoides totais dos segmentos apicais de *P. capillacea* após 7 dias de cultivo (n = 6; média ± DP). As diferentes letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste unifatorial ANOVA e o teste de Tukey (p ≤ 0.05).....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 8 - Concentrações de fenólicos totais das amostras de *P. capillacea* após 7 dias de cultivo (n = 6; média ± DP). As diferentes letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste unifatorial ANOVA e o teste de Tukey (p ≤ 0.05).....**Erro! Indicador não definido.**

Figura 9 - Concentrações de flavonoides das amostras de *P. capillacea* após 7 dias de cultivo (n = 6; média ± DP). As diferentes letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste unifatorial ANOVA e o teste de Tukey (p ≤ 0.05)...**Erro! Indicador não definido.**

Figura 10 - Microscopia de Luz de secções transversais de *P. capillacea* após 7 dias de cultivo. A. Controle. B-C-D-E. Amostras expostas ao metal Chumbo com concentrações de 15, 30, 45 e 60ppm respectivamente. F-G-H-I. Amostras expostas ao metal Manganês com concentrações de 15, 30, 45 e

60ppm respectivamente. CC, Células Corticais; PC, Parede Celular.....**E**
rro! Indicador não definido.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do meio nutritivo von Stosch, para o preparo de 2 L de solução padrão. Reagentes utilizados: ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), nitrato de sódio (NaNO_3), fosfato de sódio hidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$), sulfato de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), e cloreto de manganês hidratado ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$).....26

Tabela 2 - Pigmentos fotossintetizantes das amostras de *P. capillacea* (mg/g, massa fresca) após 7 dias de cultivo ($n = 6$; média \pm DP). As diferentes letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste unifatorial ANOVA e o teste de Tukey ($p \leq 0.05$). Chl *a*, Clorofila *a*; AFC, Aloficocianina; FC, Ficocianina; FE, Ficoeritrina.....**Erro! Indicador não definido.**

Tabela 3 - Concentrações de açúcares solúveis totais e amido ($\mu\text{g/g}$ de massa seca) das amostras de *P. capillacea* após 7 dias de cultivo ($n = 6$; média \pm DP). As diferentes letras indicam diferenças significativas de acordo com o teste unifatorial ANOVA e o teste de Tukey ($p \leq 0.05$).....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFC	Aloficocianina
CC	Células corticais
CCB	Centro de Ciências Biológicas
Chla	Clorofila <i>a</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FC	Ficocianina
FE	Ficoeritrina
LABCEV	Laboratório de Biologia Celular Vegetal
ML	Microscopia de Luz
Mn	Manganês
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
Pb	Chumbo
PC	Parede celular
TC	Taxa de crescimento

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	Macroalgas Marinhas e a Sua Importância.....	13
1.2.	Divisão Rhodophyta.....	14
1.3.	<i>Pterocladiaella capillacea</i> (S.G. Gmelin) Santelices e Hommersand.....	15
1.4.	Poluição Por Metais Pesados No Ambiente.....	17
1.5.	Chumbo.....	19
1.6.	Manganês.....	20
2.	JUSTIFICATIVA.....	23
3.	OBJETIVOS.....	24
3.1.	Objetivos Gerais.....	24
3.2.	Objetivos Específicos.....	24
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1.	Coleta e Processamento do Material Biológico.....	25
4.2.	Desenho Experimental.....	27
4.3.	Avaliação da Taxa de Crescimento (TC).....	28
4.4.	MTT.....	29
4.5.	Extração de Pigmentos.....	29
4.6.	Extração e Quantificação de Carotenoides Totais.....	30
4.7.	Determinação do Conteúdo de Compostos Fenólicos Totais...31	
4.8.	Determinação do Conteúdo de Flavonoides Totais.....	31
4.9.	Extração e Dosagem de Açúcares Solúveis Totais.....	32
4.10.	Extração e Dosagem de Amido.....	33
4.11.	Microscopia De Luz (ML).....	33
4.12.	Análise e Interpretação dos Resultados.....	35

5.	RESULTADOS.....	36
5.1.	Morfologia dos Segmentos Apicais de <i>Pterocladia capillacea</i>	36
5.2.	Taxas de Crescimento.....	37
5.3.	MTT.....	38
5.4.	Pigmentos Fotossintetizantes.....	38
5.5.	Carotenoides.....	40
5.6.	Fenólicos e Flavonoides.....	41
5.7.	Açúcares Solúveis e Amido Total.....	42
5.8.	Microscopia de Luz.....	43
6.	DISCUSSÃO.....	45
7.	CONCLUSÕES FINAIS.....	52
8.	REFERÊNCIAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

1.1. Macroalgas Marinhas e a Sua Importância

As macroalgas marinhas pertencem a um grupo heterogêneo e muito diverso de organismos fotossintetizadores e avasculares, com estruturas reprodutivas desprotegidas, produtoras de esporos e desprovidas de sementes e flores (SOUTH;WHITTICK, 1987). Por não apresentarem uma estrutura vegetal diferenciada em raiz, caule e folhas, as macroalgas são agrupadas de acordo com critérios como: morfologia, ciclo de vida, composição da parede celular, natureza química dos produtos de reserva energética, bioquímica, biologia molecular, pigmentos fotossintéticos e a estrutura celular (GRAHAM e WILCOX, 2000) em Chlorophyta, Rodophytae Ochrophyta (Phaeophyceae) (WYNNE, 2005).

As macroalgas são encontradas em praticamente todos os ambientes marinhos, sendo mais abundantes em ambientes costeiros tropicais. A distribuição vertical das algas, em costões rochosos, é limitada pelo gradiente formado pela penetração da luz na coluna d'água em quantidade suficiente para equilibrar a respiração celular e manter os processos metabólicos e investimentos na reprodução. Algumas espécies estão adaptadas para resistir a longos períodos de imersão e tornam-se resistentes à dessecação dos períodos de maré baixa, formando zonas distintas de diferente composição ficológica. Outras algas, por sua vez, não suportam exposição ao ar e vivem permanentemente submersas (OLIVEIRA, 2002).

Os recentes avanços científicos na farmacologia marinha têm revelado diversos compostos bioativos, ampliando as possibilidades de aplicação das algas como fonte direta de medicamentos ou inspirando a síntese de novas substâncias a partir das estruturas moleculares descobertas. Os constituintes das algas incluem substâncias antibacterianas, antibióticas, anti-fúngicas e até mesmo antivirais, que podem contribuir grandemente para a área econômica (FREITAS et al., 1988).

No ambiente, as algas são de extrema importância, pois servem como bioindicadores da qualidade ambiental, auxiliam em processos de remediação em locais poluídos, são produtores primários dos oceanos e realizam a produção de oxigênio atmosférico (OLIVEIRA et al., 1999). Além disso, as algas também constituem a base da cadeia alimentar, em ambientes marinhos, e fazem parte de áreas de berçário e habitat para peixes e invertebrados (NORTON et al., 1996).

1.2. Divisão Rhodophyta

As rodófitas, conhecidas como as algas vermelhas constituem o grupo com o maior número de espécies na costa brasileira (USOV, 1992). Nessa divisão, são reconhecidas quatro classes: Rhodellophyceae, Compsopogonophyceae, Bangiophyceae e Florideophyceae (WYNNE, 2005) e de acordo com Woelkerling, (1990), existem cerca de 4000 a 6000 espécies de algas vermelhas, distribuídas em aproximadamente 700 gêneros (KRAFT, 1981).

As algas desta divisão são seres eucariotos, com clorofila *a* e ficobilinas (b, r e c-ficoeritrina, aloficocianina e c e r-ficocianina), além

de xantofilas e amido como substância de reserva. Em certos casos, as cores podem variar dependendo do tipo e quantidade do pigmento acessório, podendo ser amarelas, verdes, azuis, vermelhas, roxas, marrons ou enegrecidas (OLIVEIRA, 2002). Ocorrem predominantemente na região equatorial e em águas salgadas, podendo estar presente em profundidades de até 260 metros em regiões de águas com elevado índice de transparência (HORTA, 2000).

O material de reserva das rodófitas é um composto que possui propriedades intermediárias entre o amido e o glicogênio chamado de amido das florídeas e fica armazenado no citoplasma. A parede celular é constituída por um esqueleto de celulose impregnado por galactanas sulfatadas, podendo ser agaranas ou carragenanas. São estas substâncias que fornecem grande importância econômica às rodófitas, tornando-as muito apreciadas pelas indústrias alimentícia, biomédica e farmacêutica (GORDON; MCCANDLESS, 1973).

1.3. *Pterocladia capillacea* (S.G. GMELIN) SANTELICES E HOMNERSAND

Pterocladia capillacea (Santelices e Homnnersand) é uma alga vermelha pertencente à Divisão Rhodophyta, classe Florideophyceae, ordem Gelidiales, família Gelidiaceae. Foi descrita a partir do gênero *Pterocladia* (PERRONE et al., 2006), onde agrupa onze espécies (MILLAR; FRESHWATER, 2005), algumas sendo utilizadas na alimentação e na produção de ágar principalmente em países como Coreia e Japão (BOO et al., 2010).

Esta espécie apresenta uma ampla distribuição geográfica no litoral do nosso país, ocorrendo desde o Estado do Espírito Santo, até o litoral de Rio Grande do Sul. Como características estruturais, esta espécie possui uma coloração vermelho-púrpura, talo cartilaginoso e muito ramificado, entre 4 a 20 cm de comprimento e 2 mm de espessura, que se fixa ao substrato por intermédio de pequenos rizoides, de onde partem ramos eretos ligeiramente achatados próximos a base, e na região apical são fortemente achatados (BOO et al., 2010; XIA et al., 2004).

Assim como a maioria das algas vermelhas, apresenta ciclo de vida trifásico, envolvendo alternância de geração de gametófitos, carposporófitos e tetrasporófitos. Dentre as várias espécies de algas vermelhas com relevância ecológica e econômica o gênero *Pterocladella* (Rhodophyta, Gelidiales) é um dos mais importantes.

Figura 1 - Espécime de *P. capillacea*.



Fonte: Autoria própria, 2015.

1.4. Poluição Por Metais Pesados no Ambiente

A contaminação do meio ambiente por metais pesados é resultado geralmente de atividades antropogênicas, principalmente atividades industriais, agrícolas e do descarte de resíduos. Estes elementos são descarregados na atmosfera, nos ambientes aquáticos e terrestres (VIEIRA; VOLESKY, 2000).

As variações frequentes de salinidade, material dissolvido e particulado na água, em curto espaço de tempo (SEELIGER; CORDAZZO, 1994), tornam difíceis o uso de monitores biológicos para metais pesados. Entretanto, as algas marinhas são mais expressivas em indicar a poluição destes metais, pois possuem mecanismos diretos de absorção (MORRIS; BALE, 1975; MELHUUS, 1978) e apresentam altos fatores de acumulação para os metais pesados (SEELIGER; EDWARDS, 1997; RICE, 1981).

Alguns metais e seus compostos têm sido associados a mecanismos de carcinogenicidade, e metais como o cádmio e chumbo têm sido amplamente estudados, tendo em vista a sua carcinogenicidade potencial para os seres humanos (BEYERSMANN; HARTWIG, 2008). Além disso, em organismos vivos o stress oxidativo pode estar relacionado com a toxicidade dos metais, o que implica em um aumento da concentração de espécies reativas de oxigénio e/ou uma redução na capacidade antioxidante celular (PINTO et al., 2003).

O stress oxidativo pode estar associado com a inibição da fotossíntese, da produção de clorofila ou de crescimento em produtores primários. Estes efeitos tóxicos podem resultar da exposição a altas concentrações de metais ou para a exposição de concentrações mais

baixas durante períodos mais longos, refletindo o fato de que a toxicidade dos metais pesados é, em grande parte, dependente da dose (BAUMANN et al., 2009). Tem sido demonstrado que a fotossíntese em algumas espécies de algas pode ser afetada pela acumulação de metais pesados (GLEDHILL et al., 1997; BAUMANN et al., 2009).

A interferência de cada metal pesado na alga depende do metal, da sua concentração e do tempo de exposição (MAMBOYA et al., 1999), além dos níveis de quelação e detoxificação de cada alga (LOMBARDI et al., 1998). No ambiente, algas vermelhas são capazes de acumular metais pesados, como resultado, os metais que se acumulam nas paredes das células podem atuar como bons biomarcadores (SHENG et al., 2004). No entanto, os metais que entram na célula podem promover alterações nas estruturas subcelulares (BOUZON et al., 2012b; SANTOS et al., 2012; GOUVEIA et al., 2013,), causando impactos cada vez mais nocivos à alga.

A partir de 1981, surgiu no Brasil uma série de regulamentações Jurídicas que tratavam das relações entre a indústria e o meio ambiente. Um exemplo disso foi a criação da Lei sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, que definiu as estratégias globais de ação sobre as questões ambientais e as estruturas organizacionais para o tratamento dessas questões (Lei nº 6.938/81) (RATTENER, 1993). Desta forma, é de extrema importância a realização de estudos relacionados ao impacto de metais no meio ambiente, com o intuito de mitigar e diminuir os danos causados ao ecossistema.

1.5. Chumbo

Poluentes como os metais pesados, promovem efeitos diretos e indiretos sobre um ecossistema, alterando as taxas de decomposição, ciclagem de nutrientes e dinâmica de oxigênio (FLEEGER et al., 2003). No ambiente, as algas vermelhas acumulam metais pesados e são biosorventes eficazes para Cobre (Cu) e Chumbo (Pb) (GARCIA-RIOS et al., 2007; VILAR et al., 2008) agindo como bons bioindicadores de qualidade ambiental. Por outro lado, os metais que entram na célula podem promover alterações nas estruturas subcelulares (GOUVEIA et al., 2013; BOUZON et al., 2012; SANTOS et al., 2012;) e promover o estresse oxidativo (LIU; PANG, 2010).

O chumbo é mundialmente usado em vários setores industriais, pois possui muitas propriedades físicas e químicas. Dentre suas aplicações pode-se destacar a indústria de baterias, revestimento de cabos, munições, proteção contra a corrosão, tintas e pigmentos, instalações de energia atômica e fundições (CHEN et al., 2007; HASAN et al., 2009). Desta forma, a ampla utilização do chumbo em diversos processos industriais gera efluentes altamente contaminados.

De acordo com estudos já realizados, percebeu-se que com variações de concentração, tempo de exposição e tipo de organismo utilizado, o metal pesado chumbo pode provocar grandes mudanças nas características morfológicas estruturais e ultraestruturais das células que compõem esse organismo. Como por exemplo em estudos realizados com a cianobactéria *Synechococcus leopoliensis* (Raciborski) Komárek, foi observado um decréscimo na taxa fotossintetizante e na quantificação de clorofila relacionadas com o aumento na concentração

de chumbo bem como, com o aumento do tempo de exposição (PINCHASOV et al., 2006). Na macroalga *Gracilariadomingensis* (Kützinger) Sonderex Dickie as taxas de fotossíntese e de crescimento celular foram reduzidas quando expostas ao metal chumbo (GOUVEIA, 2013).

No trabalho realizado por Santos et al. (2014) com a alga vermelha *Gelidium floridanum*, foi observado que o chumbo, além de influenciar negativamente nas taxas de crescimento, também promoveu alterações na ultraestrutura dos cloroplastos, na quantificação de flavonoides e pigmentos fotossintetizantes, que por sua vez ocasionaram a despigmentação, necrose, redução de clorofila *a*, aumento na síntese de carotenoides, dentre outras mudanças importantes no metabolismo celular da espécie, influenciando diretamente no seu desenvolvimento.

No Brasil o CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, estabelece na Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011 concentrações máximas de 0,5 mg/L em lançamento de efluentes de qualquer fonte poluidora. Diante desse quadro, faz-se necessário maiores estudos com este metal e no ecossistema no qual ele se encontra, com o fim de promover um tratamento adequado e prevenir possíveis impactos ao ambiente.

1.6. Manganês

O manganês (Mn) é um metal cinza claro que não ocorre na forma pura (elementar), mas combinado com outras substâncias, como o oxigênio, enxofre e cloro. Processos naturais e a atividade humana são capazes de modificar compostos de manganês. O Mn inorgânico

(retirado de rochas) é usado na fabricação de ligas metálicas, especialmente aços, em pilhas, palitos de fósforo, vidros, fogos de artifício, na indústria química, de couro e têxtil, e como fertilizante(MARTINS et al., 2003).

O manganês e seus compostos podem existir na atmosfera na forma de partículas em suspensão, resultantes da erosão do solo, emissões industriais e vulcânicas, assim como da queima de gasolina contendo TMM (tricarbonilmetilciclopentadienilmanganês). Na água, o manganês ocorre nas formas dissolvida e suspensa, que variam conforme pH e potencial redox. A água subterrânea anaeróbia frequentemente contém níveis elevados de manganês dissolvido. Em rios, o manganês é transportado e adsorvido a partículas suspensas dos sedimentos (MARTINS et al., 2003).

São encontrados na literatura dados referentes à toxicidade do manganês para algumas microalgas. Concentrações entre 3 e 50 mg.L⁻¹ são causadoras de inibição da divisão celular, da fotossíntese e da captura de carbono em *Chlorella*, conforme reportado por Christensen eScherfig (1979). Esses mesmos autores, reportaram ainda que a concentração de 3,1 mg.L⁻¹ de manganês é suficiente para causar redução de 50% no crescimento celular de *Selenastrumcapricornutum*Printz. Hue et al. (1998) apresentaram concentrações entre 0,1 e 0,5 mg.L⁻¹ de manganês como sendo o limite para a observação de efeitos danosos desse elemento sobre plantas cultivadas.

Atualmente há pouca literatura relacionada aos impactos do metal manganês em macroalgas, a grande maioria concentra-se em

trabalhos com plantas, como a Goiabeira (SALVADOR et al., 2003) e Cana-de-açúcar (BENETT et al., 2012). No entanto, acredita-se que este metal seja um micronutriente essencial para o desenvolvimento de plantas, pois auxilia no desenvolvimento de raízes, na síntese da clorofila e ativação de enzimas (MALAVOLTA, 2006). Da mesma forma, o excesso deste metal também pode causar efeitos tóxicos, como danos primários na parte aérea das plantas, causando manchas marrons, bem como efeitos secundários nas raízes, impedindo um crescimento adequado (FOY, 1973). De acordo com Foy et al., (1978) o efeito da toxidez de manganês nas plantas é difícil de ser estudado isoladamente, devido as interações existentes entre ele e outros elementos, tais como Fe, Al, Si e Ca.

Na resolução CONAMA Nº 430, de 13 de maio de 2011 os padrões de lançamento de efluentes, estimam os valores máximos do descarte do metal Manganês para 1,0 mg/L. Infelizmente são observados constantemente um aumento excessivo dos valores máximos de vários metais no ambiente, impactando negativamente os organismos. Desta forma, estudos na área de toxicologia tornam-se muito importantes para evitar cada vez mais efeitos nocivos em ambientes aquáticos.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando o contínuo descarte de metais pesados nos ambientes aquáticos tanto por via antrópica, quanto por via natural, podemos considerar um constante aumento dos impactos gerados pela toxicidade destes produtos nos diferentes organismos e no ecossistema como um todo. Tendo em vista a importância ecológica das algas marinhas e por possuírem a capacidade de acumular metais facilitando a entrada destes compostos na cadeia alimentar, tem-se a necessidade de estudar o potencial danoso que esses metais podem causar sobre os organismos aquáticos. Desta forma, o presente estudo pretende avaliar as alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas da macroalga *Pterocladia capillacea* sob exposição aos metais Chumbo e Manganês.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos da exposição aos metais pesados chumbo e manganês sobre a morfofisiologia da macroalga vermelha *Pterocladiallacapillacea*.

3.2. Objetivos Específicos

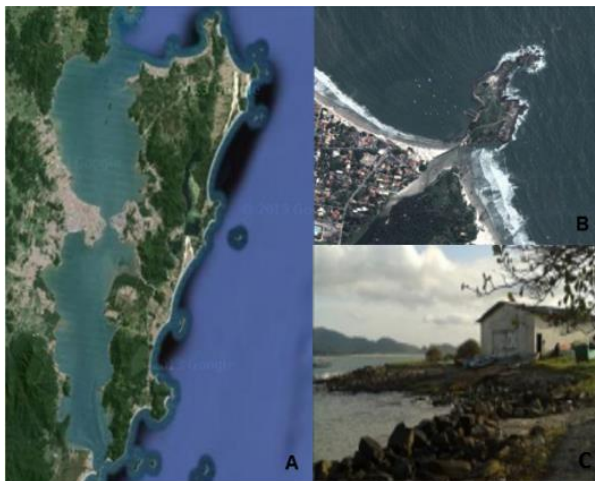
- Analisar as possíveis alterações morfológicas causadas pela exposição ao chumbo e manganês nas amostras de *P. capillacea*;
- Avaliar as taxas de crescimento de *P. capillacea* após a exposição com as diferentes concentrações de chumbo e manganês;
- Determinar o conteúdo de carotenoides totais após a exposição aos metais chumbo e manganês;
- Determinar o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides após a exposição aos metais chumbo e manganês;
- Determinar a viabilidade celular das amostras de *P. capillacea* após a exposição aos metais chumbo e manganês;
- Determinar as concentrações dos pigmentos fotossintetizantes (clorofila *a* e ficobiliproteínas) após a exposição aos metais chumbo e manganês;
- Determinar as concentrações de açúcares solúveis e amido após a exposição aos metais chumbo e manganês.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta e Processamento do Material Biológico

Os espécimes de *P. capillacea* foram coletados nos costões rochosos da praia da Armação do Pântano do Sul, Ilha de Santa Catarina - Florianópolis, (Figura 2) e transportados para o Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV), da UFSC. No laboratório, as algas foram triadas e limpas para que se faça a total remoção de epífitas e pequenos crustáceos. Asporções apicais saudáveis das algas foram selecionadas e cultivadas em água do mar enriquecida com a solução de meio von Stosch (Tabela 1) durante 7 dias em condições controladas: temperatura de $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com salinidade de 35 ups (unidade padrão de salinidade), aeração constante, irradiância de $80 \pm 10 \mu\text{mol f\acute{o}tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (lâmpadas fluorescentes, Philips C-5 Super 84 16W/840), e foto-período de 12 horas, iniciando as 8h.

Figura 2 – Local de coleta da *Pterocladia capillacea*. **A.** Ilha de Santa Catarina - Florianópolis, Brasil. **B.** Praia da Armação. **C.** Vista do local onde foram coletados os exemplares da macroalga.



Fonte: Giulia Burle Costa com adaptações; 2015

Tabela 1 - Composição química da solução de von Stosch, para o preparo de 2 L de solução padrão.

Reagentes	Soluções padrão em água destilada	Concentração dos reagentes
EDTA	-	0.93 g
NaNO ₃	-	10.625 g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O	-	2.0112 g
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	-	0.1738 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	-	0.0248 g
Tiamina	0.100 g/100 mL	25 mL
Biotina	0.0125 g /100 mL	1.0 mL
Cianocobalamina	0.0125 g /100 mL	1.0 mL

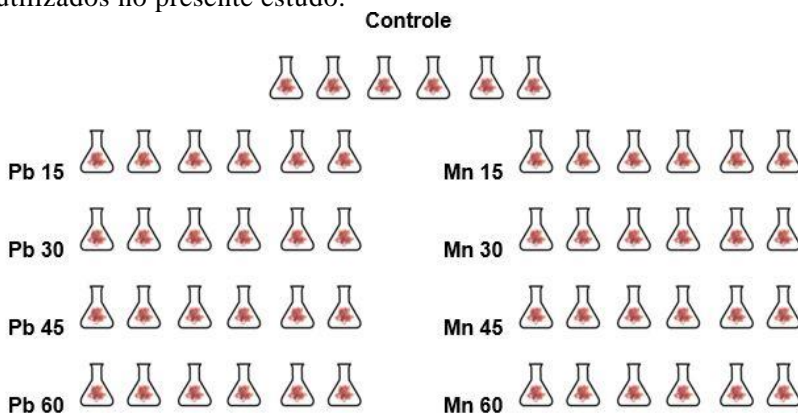
Fonte: Edwards (1970) com adaptações.

4.2. Desenho Experimental

Após o período de limpeza e aclimação das algas, porções de aproximadamente 4.0g de *P. capillacea* foram cultivados em frascos do tipo Erlenmeyer de 500mL contendo água do mar acrescida de meio von Stosch 50% sem ácido etilenodiamino tetra-acético – EDTA (EDWARDS, 1970), em concentrações crescentes de chumbo e manganês: 0 (controle), 15, 30, 45 e 60ppm. As concentrações utilizadas para o metal chumbo, foram baseadas no trabalho desenvolvido porRovaiet al.,(2013)e para fins comparativos, as mesmas concentrações foram utilizadas para o metal manganês, já que este carecia de dados na literatura.

As algas foram divididas em 6 réplicas para cada concentração, totalizando 54 amostras. Foramavaliadas as suas respostas físicas, químicas e biológicas através de uma exposição de sete dias com os metais pesados chumbo e manganês, mais o grupo controle. Após estes sete dias, foi realizada a pesagem do material para avaliar se houve aumento de biomassa. Foram tiradas fotografias de cada amostrapara posterior análise e foi feita a seleção de uma parte do material para a montagem de microscopia de luz.

Figura 3 - Desenho esquemático dos nove grupos experimentais utilizados no presente estudo.



Fonte: Autoria própria, 2015.

4.3. Avaliação da Taxa de Crescimento (TC)

A taxa de crescimento das amostras foi avaliada através da diferença entre o peso da matéria fresca ao início e ao final do experimento. As TC's foram obtidas a partir do aumento da massa fresca das amostras e apresentadas como porcentagem de crescimento diário, calculadas a partir da fórmula de Penniman et al., (1986):

$$T_{cm} = [(M_f / M_i)^{1/t} - 1] * 100, \text{ sendo:}$$

Taxa de crescimento (T_{cm}) em %.dia-1;

Massa final (M_f) em gramas;

Massa inicial (M_i) em gramas;

Tempo (t) em dias.

4.4. MTT

As análises de viabilidade celular foram medidas usando amostras de *Pterocladiallacapillacea* (0,250 g de massa fresca, n = 6) baseadas na redução do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio de brometo (MTT, Sigma -Aldrich, St. Louis, MO, EUA) determinando a viabilidade celular através da redução do sal de tetrazólio em formazan por enzimas desidrogenases mitocondriais que reduzem o MTT em um composto insolúvel púrpura, dependendo da viabilidade das células.

A concentração de formazan foi determinada espectrofotometricamente, uma vez que este é proporcional à quantidade de mitocôndria ativa e, por consequência, o número de células vivas. Os segmentos de alga foram cuidadosamente lavadas com água do mar esterilizada, e a amostra foi incubada com uma solução estoque 30 µL de MTT (0,17 g L⁻¹ de MTT) num tubo de ensaio com água do mar esterilizada (3 ml de volume final), que foram mantidas a 37° C durante 3 horas. Fragmentos de alga foram então lavadas em água destilada, e transferidos para um tubo de ensaio contendo 1,0 ml de dimetil sulfoxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG) (MENDES et al, 2013). A absorvância foi determinada com um espectrofotômetro de microplacas Tecan (Infinite M200 PRO, Männedorf, Suíça), a 570 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem (%), considerando a absorvância de amostras ambientais com o controle (100%).

4.5. Extração de Pigmentos

Com a finalização dos experimentos, amostras de aproximadamente 1 g de peso fresco de *P. capillacea* foram congeladas

em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C para análises posteriores de clorofila *a* e ficobiliproteínas, conforme protocolo estabelecido por Schmidt et al. (2010). A Clorofila *a* foi extraída em 3 mL de dimetilsulfóxido (DMS, Merck, Darmstadt, FRG) a 40°C , durante 30 minutos, com auxílio de um homogenizador de tecidos (HISCOX; ISRAELSTAM, 1979; SCHMIDT et al., 2010), e quantificada através de espectrofotômetro de UV/vis (Hitachi, Model 100-20; Hitachi, Co., Japão), de acordo com Wellburn (1994).

Já a extração de ficobiliproteínas (aloficocianina - AFC, ficocianina - FC e ficoeretrina - FE) foi realizada através da trituração de 1g de massa fresca, para cada repetição, em nitrogênio líquido. O macerado foi suspenso em tampão fosfato 0.05 M, pH 6.4, no escuro e em temperatura de 4°C . O homogenizado foi centrifugado a 2.000 rpm, durante 20 minutos. A concentração de ficobiliproteínas foi determinada utilizando as equações descritas por Kursar et al. (1983).

4.6. Extração e Quantificação de Carotenoides Totais

As amostras de *P. capillacea* foram preparadas segundo Aman et al., (2005), com modificações. Primeiramente as algas foram dessalinizadas pela adição de formiato de amônio 0,5 M por 30 segundos, seguida por duas lavagens com água destilada. As amostras (aproximadamente 1g – massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido e acrescidas de 10 mL de metanol P.A. As amostras foram mantidas em repouso (1 hora) em câmara escura. O extrato recuperado foi centrifugado por 10 minutos a 4000 rpm, após, recuperado novamente. Os extratos foram submetidos à espectrofotometria UV-Vis

(Hiatachi U-1800) para determinação do teor de carotenoides totais ($\lambda = 450 \text{ nm}$).

4.7. Determinação do Conteúdo de Compostos Fenólicos Totais

Amostras de *P. capillacea* foram primeiramente dessalinizadas pela adição de formiato de amônio 0,5 M por 30 segundos, seguida por duas lavagens com água destilada. As amostras (aproximadamente 1g – massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido e acrescidas de 10 mL da solução de metanol 80%. As amostras foram mantidas em repouso (1 hora) em câmara escura. A análise dos compostos fenólicos foi realizada usando o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu baseado em Waterman e Mole (1994). Aliquotas de 300 μL provenientes do sobrenadante dos extratos foram adicionadas a uma solução de 225 μL do reativo Folin-Ciocalteu (Vetec) e 2,5 mL de carbonato de sódio 2% (Na_2CO_3) e incubados durante 1h a temperatura ambiente. Em seguida procedeu-se a leitura das amostras a 750 nm em espectrofotômetro (Tp Reader; Thermoplate, China). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em μg de ácido gálico por g de massa seca.

4.8. Determinação do Conteúdo de Flavonoides Totais

Amostras de *P. capillacea* foram primeiramente dessalinizadas pela adição de formiato de amônio 0,5 M por 30 segundos, seguida por duas lavagens com água destilada. As amostras (aproximadamente 1g – massa fresca) foram trituradas em nitrogênio líquido e acrescidas de 10

mL da solução de metanol 80%. As amostras foram mantidas em repouso (1 hora) em câmara escura. O conteúdo total de flavonoide foi determinado pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio (AlCl_3) (ZACARIAS et al, 2007). Alíquotas de 0,5mL do extrato foram adicionados a 2,5mL de etanol e 0,5mL em cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), incubados em temperatura ambiente por 1h e a absorbância foi mensurada a 420 nm (Hitachi, Model 100-20).

4.9. Extração e Dosagem de Açúcares Solúveis Totais

A extração de açúcares solúveis totais foi feita de acordo com a metodologia proposta por Shannon (1968). As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido (1 g – massa fresca) e adicionado 2mL da solução MCW (metanol:clorofórmio:água) (12:5:3, v/v). A solução foi centrifugada (4000 rpm) por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de MCW (5 minutos a 4000 rpm. Os sobrenadantes foram reunidos (4 mL), adicionados de 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada e o extrato foi novamente centrifugado. A fase superior dos extratos foi coletada e utilizada para análise dos açúcares. A dosagem dos açúcares solúveis totais foi realizada de acordo com o método de Umbreit e Burris (1964). Alíquotas de 1 mL do extrato foram acrescidos de 2 mL do reagente antrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), sendo agitados em vórtex e aquecidos em banho-maria a 100° C por 3 minutos. Após, procedeu-se a leitura das amostras a 630 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca.

4.10.Extração e Dosagem de Amido

A metodologia descrita por McCready et al, (1950) foi utilizada para determinar o teor de amido. Ao resíduo da centrifugação do extrato estabelecido conforme o item 4.9 foram adicionados 2 mL de ácido perclórico 30 % (v/v). A solução foi centrifugada (4000 rpm) por 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e o resíduo foi novamente extraído com 2 mL da solução de ácido perclórico 30 % (5 minutos a 4000 rpm). Os sobrenadantes foram reunidos. A dosagem do amido foi realizada de acordo com o método de Umbreit e Burris (1964). Alíquotas de 1 mL do extrato foram acrescidas de 2 mL do reagente antrona (200 mg de antrona em 100 mL de ácido sulfúrico concentrado), sendo agitados em vórtex e aquecidos em banho-maria a 100° C por 3 minutos. Após, foi feita a leitura das amostras a 630 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mg de glucose por g de massa seca.

4.11.Microscopia De Luz (ML)

Os materiais expostos aos metais chumbo e manganês e os do grupo controle foram processados para análises citoquímicas e morfológicas em microscopia de luz. As amostras foram fixadas em solução de paraformaldeído 2.5 % em tampão fosfato 0.1 M, pH 7.2, à temperatura de 4° C, em *overnight*. Após a fixação, em temperatura ambiente, o material foi lavado com tampão fosfato, duas vezes, por 10 minutos em cada troca (BOUZON, 1993), e em seguida foi desidratado, com uma série de concentrações crescentes de etanol. A pré-infiltração das amostras foi realizada com uma mistura de 1:1 de etanol a 100% e

historesinaglicolmetacrilato (GMA), durante 12 h, posteriormente o material foi infiltrado em resina pura (LeicaHistoresin, Heidelberg, Alemanha). As amostras foram seccionadas em micrótomo manual de parafina modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio. As secções com espessura de 5 µm foram distendidas em placa de Petri com água à temperatura ambiente, coletadas com lâminas de vidro ou coletadas nas lâminas sobre gotas de água destilada e secos a 37°C por 30 minutos.

O teste citoquímico no qual o material foi submetido, foi o AT-O (Azul de Toluidina. Este corante foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O 0,5%, acidificada com HCl 1N para pH 3,0, por 30 segundos, lavadas em água destilada e secas ao ar (GORDON; MCCANDLESS, 1973; MCCULLY, 1970). Após as lâminas prontas e coradas, as imagens foram adquiridas no sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América). Também foram mensurado o comprimento, largura e espessura da parede celular das células corticais (n=50).

4.12. Análise e Interpretação dos Resultados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância(ANOVA)unifatorial, seguidos do teste de Tukey, com a finalidade de verificar a significância das diferenças encontradas entre os tratamentos com chumbo e manganês e seus respectivos controles. Todas as análises foram realizadas no Programa Statistica (versão 10.0).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que os metais chumbo (Pb) e manganês (Mn) induzem diferentes níveis de respostas fisiológicas, bioquímicas e morfológicas na alga vermelha *Pterocladia capillacea*, evidenciando a ativação de diferentes mecanismos que promovem a absorção e a relação de toxicidade destes poluentes antrópicos.

Ao final dos 7 dias de experimento, as amostras de *P. capillacea* expostas ao metal Pb apresentaram uma despigmentação acentuada nos segmentos apicais em todos os tratamentos. Entretanto, o Mn não alterou o padrão de pigmentação da alga, apresentando as mesmas características morfológicas que o controle. A despigmentação dos segmentos apicais das amostras tratadas com o Pb é possivelmente resultado da diminuição na concentração das ficobiliproteínas como: a aloficocianina (AFC), a ficocianina (FC) e a ficoeritrina (FE), que além de promoverem o pigmento de cor vermelha às algas, desempenham uma função essencial na transmissão da energia de excitação dos pigmentos mais externos em sequência a partir da FE, FC e AFC para as moléculas de clorofila *a* do fotossistema II (ZUBER, 1986).

A despigmentação dos segmentos apicais das algas, também foi observada em macroalgas vermelhas em exposição ao metal Cobre (Cu) por Xia et al., (2004) em *Gracilaria lemaneiformis* (Bory) Greville, e com o metal Pb, por Gouveia et al., (2013) em *Gracilaria domingensis* (Kützinger) Sonderex Dickie e por Santos et al., (2015) em *Hypnea musciformis* (Wulfen) J.V. Lamouroux.

As amostras de *P. capillacea* tratadas com o metal Pb, não apresentaram diferenças significativas nas taxas de crescimento quando comparados ao controle, com exceção da concentração de 45ppm que demonstrou um pequeno decréscimo. Esse resultado pode ter ocorrido devido a alga ter fabricado compostos de defesa para impedir a entrada do metal nas células, não interferindo negativamente no seu crescimento.

Os tratamentos com metal Mn, apresentaram aumento na taxa de crescimento em comparação ao controle, corroborando com estudos que indicam que este metal é um micronutriente essencial no desenvolvimento de plantas e atua em processos de fotossíntese e produção de enzimas regulatórias (MALAVOLTA et al., 1997; MALAVOLTA, 2006). No entanto, o grupo exposto a concentração de 30ppm de Mn obteve uma redução em sua biomassa. Este resultado por ter ocorrido devido a uma condição de estresse na alga, relacionada a concentração do metal, levando a uma desregulação no seu metabolismo celular. Entretanto, o efeito prejudicial do Mn é difícil de ser estudado isoladamente, pois este metal interage com outros elementos possivelmente causadores de estresse em algas.

A viabilidade celular pode ser medida através de várias técnicas, envolvendo a utilização de ferramentas que qualificam e/ou quantificam células “vivas”, ou seja, células metabolicamente ativas em uma cultura (ROGERO et al., 2000). A técnica de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) utilizada neste estudo consiste na verificação da viabilidade celular com base no dano induzido nas mitocôndrias. O princípio deste método é a avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais, quantificadas pela redução

do MTT (um sal de coloração amarela solúvel em água) à formazan (cristais de coloração púrpura, insolúveis em água) (LI; SONG, 2007).

Com o ensaio de MTT, foi possível verificar uma diminuição significativa na taxa de viabilidade celular das algas de *P. capillacea* expostas aos metais Pb e Mn, em comparação as algas do grupo controle, demonstrando que provavelmente estes metais produziram efeitos negativos nos componentes celulares da alga. Desta forma, a viabilidade celular pode ser considerada uma maneira de medir o efeito tóxico de um poluente.

A concentração de clorofila *a* apresentou diferenças significativas nas algas expostas aos metais Pb e Mn. Os grupos expostos ao metal Pb, nas concentrações de 15, 30 e 60ppm apresentaram um pequeno decréscimo com relação ao controle, enquanto que na concentração de 45ppm houve uma diminuição de mais de 50% em comparação ao grupo controle. As algas expostas ao metal Mn apresentaram um aumento na quantidade de clorofila *a* nos grupos com concentração de 15 e 30ppm e uma diminuição nos grupos de 45 e 60ppm.

De acordo com Greger e Ogren (1991) a redução do conteúdo de clorofila *a* pode estar associado a deficiência de magnésio e ferro ou a inibição da síntese de enzimas responsáveis pela sua produção (STOBART et al., 1985). Além disso, a clorofila *a* é o último pigmento a ser afetado em condições de estresse (ESWARAN et al., 2002). Em trabalhos como o de Xia et al., (2004), a concentração de clorofila *a* na alga *G. lemaneiformis* (Bory) Gréville exposta ao metal Cu não apresentou alterações, enquanto que na alga

*Gracilariacoronopifolia*J.Agardh tratada com Cu houve uma redução na concentração de clorofila *a* (OLOGUIM et al., 2009). Logo, os resultados obtidos neste estudo indicam que a resposta pigmentar das algas depende do metal utilizado, da sua concentração e da espécie de alga estudada.

As algas expostas ao Pb e Mn apresentaram uma redução na quantidade de carotenoides quando comparadas ao controle. Os carotenoides são importantes compostos de baixo peso molecular, que atuam como antioxidantes (LI et al., 2006), sendo sintetizados e armazenados em cloroplastos como antioxidantes lipofílicos, (ROMER et al., 2002). De acordo com Gouveia et al., (2013), a produção de carotenoides é uma estratégia para evitar os efeitos das EROS, bem como uma das estratégias de defesa contra a radiação ultravioleta B (RUVB), que direta ou indiretamente absorvem a energia do RUVB (SOMMARUGA, 2001; SONNTAG et al., 2007; SCHMIDT, 2011). No entanto, no estudo com a alga *Acanthophoraspicifera*(M.Vahl) Børgesen exposta à radiação, houve uma redução no conteúdo de carotenoides (PEREIRA, 2014).

A redução na quantidade de carotenoides na macroalga *P. capillaceae* pode ter ocorrido devido à degradação deste componente na célula para outros mecanismos de defesa, como produção de enzimas e acúmulo de compostos fenólicos. No grupo exposto ao Mn na concentração de 45ppm, houve um aumento no conteúdo de carotenoides, o que indica que nesta concentração pode ter ocorrido um aumento de EROS e consequentemente uma maior produção de carotenoides para inibir seus efeitos.

A quantidade de fenólicos e flavonoides nas algas expostas aos metais Pb e Mn reduziu em comparação ao grupo controle. Esses compostos são originados do metabolismo secundário das plantas, e desempenham um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres nos organismos. De acordo com Collen et al., (2003), os flavonoides são sintetizados com o propósito de impedir o estresse oxidativo. No trabalho de Santos et al., (2015) este resultado também foi observado em exposição aos metais Cu e Pb na macroalga *H. musciformis*, (Wulfen) J.V.Lamouroux enquanto que com a alga parda *Sargassumcymosum* C. Agardh houve um aumento na quantidade de compostos fenólicos (COSTA et al., 2015).

De acordo com os resultados observados neste estudo, infere-se que a ação dos compostos fenólicos como ação antioxidante em *P. capillacea*, pode ter sido muito expressiva provocando a sua redução. Além disso, esta via metabólica também pode ter sido desviada para outro mecanismo de defesa, em resposta a ação do efeito tóxico dos metais.

Em algas vermelhas, a síntese e reserva de grãos de amido ocorre no citosol (PUESCHEL, 1990), sendo desta forma mais suscetível as alterações provocadas pelo estresse de metais pesados. Nas algas expostas ao metal Pb, houve uma oscilação na quantidade de amido, de modo que nas concentrações de 15 e 30ppm houve uma diminuição, enquanto que nas concentrações de 45 e 60ppm houve um aumento em relação ao controle. As algas expostas ao Mn obtiveram um decréscimo nos grãos de amido, no entanto no grupo com concentração de 60ppm houve um aumento de 29% comparado ao grupo controle. De acordo com Bouzon et al., (2012), mudanças na rota de biossíntese

destas reservas, tais como no Ciclo de Calvin, podem resultar na inibição da síntese de reservas, bem como na ativação de vias de degradação, de forma a gerar energia para a produção de compostos de defesa, dentre eles aminoácidos, enzimas e carotenoides.

Com relação a quantidade de açúcares solúveis nas amostras de *P. capillacea*, foi observada uma redução significativa em todos os grupos expostos aos metais Pb e Mn. Pelo fato deste componente ser responsável pela maquinaria estrutural e como fonte de reserva de energia para as células, acredita-se que esta diminuição ocorreu em resposta ao dano celular que os metais causaram nas algas ao longo da exposição.

Por fim, as análises de microscopia de luz não apresentaram alterações na morfologia celular e nos polissacarídeos sulfatados da parede celular em ambos os tratamentos. Entretanto, no trabalho de Felix, (2014) foi observado aumento na espessura da parede celular de *P. capillacea* em exposição ao metal Cd. Assim, sugere-se que estudos futuros com a alga vermelha *P. capillacea* analisando a organização topográfica das células e a organização ultraestrutural, pode auxiliar na compreensão dos possíveis mecanismos celulares envolvidos no processo de detoxificação celular sob ação dos metais Pb e Mn.

6. CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse estudo revelaram modificações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas sobre a macroalga *P. capillacea* em resposta a exposição aos metais pesados chumbo e manganês. A exposição ao metal chumbo resultou em efeitos mais tóxicos nas amostras de *P. capillacea*, quando comparados aos efeitos do manganês. No entanto, em ambos os tratamentos houve decréscimos na taxa de viabilidade celular, redução dos pigmentos fotossintetizantes, diminuição na quantidade de compostos fenólicos e de açúcares e amido. A microscopia de luz não revelou modificações na parede celular das algas tratadas, porém estudos mais detalhados de microscopia podem revelar de forma mais efetiva os impactos negativos que estes metais produziram nas células. Desta forma, conclui-se que os metais pesados chumbo e manganês afetaram negativamente a macroalga *P. capillacea*, em maior ou menor escala, tendo em vista que o Mn é um micronutriente essencial para o metabolismo celular, participando do processo de fotossíntese, enquanto que o Pb não apresenta tal característica.

8. REFERÊNCIAS

AMAN, R. et al. Isolation of carotenoids from plant materials and dietary supplements by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 1074, p. 99–105, 2005.

ARENZON, A.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Influência do Manganês em Ensaios de Toxicidade com Algas em Amostras Ambientais. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 1, p. 7-16, 2006.

BAUMANN, H. A. et al. Metal accumulation and toxicity measured by PAM - Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae. **Ecotox Environ Safe** 72: 1063-1075, 2009.

BENETT, C. G. S. et al. Fontes e doses de manganês no acúmulo de nutrientes na palhada em cana-de-açúcar. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, supplement 1, p. 8-16, Mar. 2012.

BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Arch Toxicol.** 82:493-512. 2008.

BOO, S. M. et al. Reexamination of the genus *Pterocladia* (Gelidiaceae, Rhodophyta) in Korea based on morphology and rbcL sequences. **ALGAE**, v. 25, n. 1, p.1-9, 2010.

BOUZON, Z. L. et al. Influences of cadmium on fine structure and metabolism of *Hypneamusciformis* (Rhodophyta, Gigartinales) cultivated in vitro. **Protoplasma**, 2012.

BOUZON, Z. L. Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypneamusciformis* (Gigartinales - Rhodophyta). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 1993.

CHEN, Y.H. et al. Heat stress increases the efficiency of EDTA in phytoextraction of heavy metals. **Chemosphere**, 67:1511-1517, 2007.

CÓLLEN, J.; PINTO, E.; PEDERSÉN, M.; COLEPICOLO, P. Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilariatenuistipitata* by pollutant metals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 45: 337-342. 2003.

CORNEJO-GARRIDO, H. et al. Oxidative stress, cytotoxicity, and cell mortality induced by nano-sized lead in aqueous suspensions. **Chemosphere**. Sep;84(10):1329-35. 2011.

COSTA G. B. et al. Effects of copper and lead exposure on the ecophysiology of the brown seaweed *Sargassumcymosum*. **Protoplasma**, 2015.

CHRISTENSEN, E. R.; SCHERFIG, J., Effects of manganese, copper and lead on *Selenastrumcapricornutum* and *Chlorella atigmatophora*. **Water Res.**, 13(1): 79-92. 1979.

EDWARDS, P. Illustrated guide to the seaweeds and sea grasses in the vicinity of Porto Arantas, Texas. **Contributions in Marine Science**. In: ALVEAL, K.; 1970.

ESWARAN, L.; MAIRH, O. P.; SUBBA-RAO, P. V. Inibition of pigments and phycocolloid in a marine red alga *Gracilaria edulis* by ultraviolet-B radiation. **Biologia plantarum**, 45(1): 157-159. 2002.

FELIX, M. R. L. Análise do perfil metabólico e de parâmetros fisiológicos e ultraestruturais de *Pterocladiallacapillacea*(Rhodophyta, Gelidiales) sob condições de estresse por cádmio e gradientes de salinidade. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis. 2014.

FLEEEGER, J. W.; CARMAN, K. R.; NISBET, R. M. Indirecteffectsofcontaminants in aquaticecosystems. **The Science of the Total Environment**, 317:207–233, 2003.

FREITAS, J. C. et al. The occurrence of tetrodotoxin and paralytic shellfish toxins in macroalgae from the Brazilian coast. **Proc. Japan. Assoc. Mycotoxicol.** (Suppl.1): p. 29-30. 1988.

FOY, C. D. Manganese and plants, Washington: **National Academy of Science**. P.51-76. 1973.

FOY, C.D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v.29, p. 511-566. 1978.

GAHAN, P. B. Plant histochemistry and cytochemistry: an introduction. London: **Academic Press**, 301p. 1984.

GARCIA-RIOS, V. et al. Cell wall composition affects Cd accumulation and intracellular thiol peptides in marine red algae. **Aquat.Toxicol.**, 81, 5-72. disponível em:<<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.11.001>> 2007.

GLEDHILL, M. et al. The toxicity of copper(II) species to marine algae, with particular reference to macroalgae. **Journal Phycology** 33: 2-11, 1997.

GORDON, E. M.; MCCANDLESS, E. L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: HARVEY, M. J.; MCLACHLAN, J. **Chondrus crispus**. Nova Scotian Institute of Science, 1973

GOUVEIA, C. et al. The effects of lead and copper on the cellular architecture and metabolism of the red alga *Gracilariadomingensis*. **Microscopy and Microanalysis**, n. 19, p. 513–524, 2013.

GOUSSIAS, C., BOUSSAC, A., and RUTHERFORD, A. W. Photosystem II and photosynthetic oxidation of water: an overview. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.Biol.Sci.* 357, 1369–1381. 2002.

GREGER, M.; ÖGREN, E. Direct and indirect effects of CD2+ on photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*). **Physiologia Plantarum**, 83(1): 129-135. 1991.

HASAN, S.H.; SRIVASTAVA, P.; TALAT, M. Biosorption of Pb(II) from water using biomass of *Aeromonashydrophila*: Central composite design for optimization of process variables. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168: p. 1155–1162. 2009.

HISCOX, J. D; ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian Journal Botany**, 57: 1332-1334, 1979.

HORTA, P.A. Macroalgas do infralitoral do sul e sudeste do Brasil: taxonomia e biogeografia. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.

HUE, N. J.; SILVA, J. A.; ARIFIN, R. Sewage sludge-soil interactions as measured by plant and soil chemical composition. **Journal of Environmental Quality**, 17: 384-390. 1998.

KRAFT, G. T. Rhodophyta: Morphology and classification. In: LOBBAN, C. S.; WYNNE, M. J. The Biology of Seaweeds. Oxford: Botanical Monographs 17, **Blackwell Scientific Publication**, 1981.

KREUSCH, M. et al. Poluição por metais pesados em regiões costeiras: efeitos do cádmio sobre macroalgas marinhas do sul do Brasil. Laboratório de Biologia Celular, Laboratório de Morfogenese e Bioquímica Vegetal, UFSC, 2012.

KURSAR, T.A.; VAN DER MEER, J.; ALBERTE, R. S. Light-harvesting system of the red alga *Gracilariarietivahiae*. II. Phycobilisome Characteristics of Pigment Mutants. **Plant Physiology**, 73: 361-369, 1983.

Li, M.; et al. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). **Chemosphere** 62: 565–572. 2006.

LI, J.; SONG, L. Applicability of the MTT assay for measuring viability of cyanobacteria and algae, specifically for *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria). **Phycologia**, v. 46, p. 593–599, 2007.

LIAO, W.R. et al. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, 30: p. 433-439, 2003.

LIU, F.; PANG, S. J. Stress tolerance and antioxidant enzymatic activities in the metabolisms of the reactive oxygen species in two intertidal red algae *Grateloupia turuturu* and *Palmariapalmata*. **Journal of Exp. Mar. Biol. Ecol.** 382, 82–87, 2010.

LOMBARDI, A. T, VIEIRA, A. A. H. Copper and lead complexation by high molecular weight compounds produced by *Synura* sp. (Chrysophyceae). **Phycologia**, 37: 34-39. 1998.

MCCREADY, R. M. et al. Determination of starch and amylase in vegetables; application to peas. **Analytical Chemistry**, Washington, 22: 1156-1158, 1950.

Mc CULLY, M.E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 175: 702-711. 1970.

MALAVOLTA, E. Manual de nutrição mineral de plantas. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 638 p. 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S. A. de. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2. ed. Piracicaba, SP: **Potafos**, 319 p. 1997.

MAMBOYA, F. A; PRATAP, H. B; MTOLERA, M; BJORK, M. The effect of copper on the daily growth rate and photosynthetic efficiency

of the brown macroalga *Padinaboergesii*. In Proceedings of the Conference on Advances on Marine Sciences in Tanzania, pp. 185-192, 1999.

MARTINS, R.J.E. Acumulação e libertação de metais pesados por briófitas aquáticas. **Dissertação de Mestrado**, Universidade do Porto: Faculdade de Engenharia. 2004.

MARTINS, I. Manganês. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. (eds). Metais: gerenciamento da toxicidade. Editora Atheneu, São Paulo, 2003.

MENDES, F. et al. Transcriptome-based characterization of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* in lactose-grown chemostat cocultures. **Appl Environ Microbiol**, 79:5949-5961. 2013.

MELHUUS, A.; SEIP, K.L.; SEIP, H.M., A preliminar study of the use of benthic algae as biological indicator of heavy metal pollution in Sotfjorden, Norway. **Environ. Pollut.** 15: p. 105-107. 1978.

MILLAR, A. J. K.; FRESHWATER, D. W. Morphology and molecular phylogeny of the marine algal order Gelidiales (Rhodophyta) from New South Wales, including Lord Howe and Norfolk Islands. **Aust. Syst. Bot.**, v. 18, p. 215-263, 2005.

MORRIS, A. W.; BALE A. J., The acumulation of cádmium, cooper, manganese and zinc by *Fucusvesiculosus* in the Bristol Chanel, Estuar, Coast. Mar. **Sci.**, 3: p. 153-163, 1975.

NICKELSEN, J.,; RENGSTL, B. Photosystem II assembly: from cyanobacteria to plants. Annu. **Rev. Plant Biol.** 64: p. 609–635. 2013.

NORTON, T. A.; MELKONIAN, M.; ANDERSEN, R. A. Algal biodiversity.**Phycologia**,35: p. 208- 326, 1996.

OLIVEIRA, E. C. et al. Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha. **Base de Dados Tropical**, disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/workshop/costa/algas>>. 1999.

OLIVEIRA, E.CMacroalgas marinhas da costa brasileira – estado do conhecimento, usos e conservação biológica. In: Araújo, E. L. et al., eds. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da flora do Brasil. Recife: **Sociedade Botânica do Brasil e UFRPE**. p:122–127, disponível em: <<http://www.ib.usp.br/algamare-br/Macroalgas.html>>. 2002.

OLOGUIM, M.; ROA, E. C.; UY, W.,; In vitro lead accumulation in *Gracilariacoronopifolia* and *Gracilariaeuchemoides*. **J. Environ. Aquatic**. Res. 39:731-735.

PENNIMAN, C. A.; MATHIESON, A. C.; PENNIMAN, C. E. Reproductive phenology and growth of *Gracilariatikvahiae* McLachlan

(Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. **Botanica Marina**, 29: 147-154, 1986.

PERRONE, C.; FELICINI, G. P; BOTTALICO, A. The prostrate system of the Gelidiales: diagnostic and taxonomic importance. **Botanica Marina**, v. 49, p. 23-33, 2006.

PEREIRA, D.T. et al. The effects of ultraviolet radiation-B response on the morphology, ultrastructure, and photosynthetic pigments of *Laurenciacatarinensis* and *Palisadaflagellifera* (Ceramiales, Rhodophyta): a comparative study. **J ApplPhycol** 26(6): 2443-2452. 2014.

PINCHASOV, Y.; BERNER, T.; DUBINSKY, Z. The effect of lead on photosynthesis, as determined by photoacoustics in *Synechococcusleopoliensis* (Cyanobacteria). **Water Air Soil Pollut** 175, 117–125, 2006.

PINTO, E. et al. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**. 39, 1008–1018, 2003.

PUESCHEL, C. M. Cell structure. In: COLE, K. M.; SHEATH, R. G. (orgs.) *Biology of the red algae*. **New York: Cambridge University Press**, 517p. 1990.

RATTENER, H. et al.; *Impactosambientais*, **CETEM**, Rio, dezembro 1993.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **Journal Cell Biol.**, 17: 208-12, 1963

RICE, D. L.; LAPOINTE B. E. Experimental outdoor studies with *Ulva fasciata* Delile. II – Trace Metal chemistry. **Journal Exp. Mar. Biol. Ecol.**, (54) p. 1-11. 1981.

ROGERO, S.O.; HIGA, O.Z.; SAIKI, M.; CORREA, O.V.; COSTA, I. **Toxicology in Vitro**, v. 14, n. 6, p. 497-504, 2000.

ROMER, S. et al. Metabolic genetic engineering of azeaxanthin-rich potato by antisense inactivation and co-suppression of carotenoid epoxidation. **Engineering** 4: 263–272. 2002.

ROVAI, A. S. et al. Photosynthetic performance of restored and natural mangroves under. **Environ Pollut.** Oct;181:233-41, 2013.

SALVADOR, J. O. et al. Influência do boro e do manganês no crescimento e na composição mineral de mudas de goiabeira. **Ciênc. agrotec.** [online]. vol.27, n.2, pp. 325-331, 2003.

SANTOS, R.; SCHMIDT, E. C.; BOUZON, Z. L. Changes in ultrastructure and cytochemistry of the

agarophyte *Gracilariadomingensis* (Rhodophyta, Gracilariales) treated with cadmium. **Protoplasma**, 2012.

SANTOS, R. W.; et al. Bioabsorption of cadmium, copper and lead by the red macroalga *Gelidiumfloridanum*: physiological responses and ultrastructure features. **Ecotox Environ Saf** 105: 80-89, 2014.

SANTOS, R. W.; et al. Avaliação das alterações fisiológicas, estruturais e ultraestruturais induzidas por cádmio, cobre e chumbo nas macroalgas *Gelidiumfloridanum*, *HypneamusciformisePalisadaflagellifera*. **Tesede Doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

SHANNON, J.C. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. **Research Bulletin (Purdue)** 842: 1-8. 1968.

SHARMA P, DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Braz J Plant Physiol.**17: 35–52. 2005.

SCHMIDT, E.C. Efeitos da radiação ultravioleta-b sobre a morfisiologia de *Kappaphycusalvarezii* (Doty) Doty ex p. Silva (Gigartinales) variantes pigmentares verde e vermelha. 140 p. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, 2009.

SCHMIDT, E.C. et al. Effects of UVB radiation on the carragenophyte *Kappaphycusalvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales):

changes in ultrastructure, growth, and photosynthetic pigments.

Hidrobiologia, 649: 171-182. 2010a.

SCHMIDT, E.C. et al. Effect of ultraviolet-B radiation on growth, photosynthetic pigments, and cell biology of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales) macroalgae brown strain. **Photosynthetica**, 48: 161-172. 2010b.

SCHMIDT, E.C. Respostas Biológicas de Macroalgas Vermelhas Submetidas à Radiação Ultravioleta-B: Análises Bioquímicas, Celulares e Fisiológicas. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Santa Catarina. 2011.

SHENG, P.X. et al. Sorption of lead, copper, cadmium, zinc and nickel by marine algal biomass: Characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. **Journal. Colloid Interface Sci.**, 275: 131-141. 2004.

SEELIGER, U.; CORDAZZO, C. Field and experimental evaluation of enteromorpha as qualitative-quantitative monitoring organisms for copper and Mercury in estuaries. **Environ. Pollut.**, 29: 197-206. 1994.

SEELIGER, U.; EDWARDS, P. Correlation coefficients and concentration factors of copper and lead in seawater and benthic algae. **Marine Pollution Bulletin** 8: 16 - 18. 1997.

SOMMARUGA, R. The role of solar UV radiation in the ecology of alpine lakes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*,

62: 35-42. 2001.

SONNTAG, B., SUMMERER, M.; SOMMARUGA, R. Sources of mycosporine-like amino acids in planktonic chlorella-bearing ciliates (Ciliophora). **Freshwater biology**, 52: 1476-1485. 2007.

SOUTH, G. R.; WHITTICK, A. Introduction of phycology. **Blackwell Scientific Publications**. 341p. 1987.

STOBART, A.; GRIFFITHS, W.; BUKHARI, I.; SHERWOOD, P. The effect of Cd^{2+} on biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. **Physiologia Plantarum**, 63: 293-298. 1985.

UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H. Method for glucose determination and other sugars. Manometric techniques. 1^a Edition. **Burgess Publishing Co.** 1964.

USOV, A.I. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. **Food Hydrocolloid**, 6:p. 9-23. 1992.

VIEIRA, R.H.; VOLESKY, B.; Biosorption: a solution to pollution? **International Microbiology**, v. 3: p. 17-24, 2000.

VILAR, M.; CARTEA, M. E.; PADILLA, G. The potential of kales as a promising vegetable crop. **Euphytica** 159: 153-165, 2008.

VISVIK, I.; RACHLIN, J. W. Ultrastructural Changes in *Dunaliellaminuta* Following Acute and Chronic Exposure to Copper and Cadmium. **Arch Environ Contam Toxicol** 23: 420-425. 1992.

XIA, Z. et al. ASP Deficiency results in increased energy expenditure in mice. **Journal of Biological Chemistry**, 279: p. 4051-4057, 2004.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. Oxford: **Blackwell Scientific Publications**, p. 248. 1994.

WELLBURN. A. R. The spectral determination of chlorophyll a and chlorophyll b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal Plant Physiol**, 144: 307–313, 1994.

WOOLERY, M. L.; LEWIN, R. A. Effects of Pb on Respiration and Photosynthesis of *Phaeodactylumtricornutum* (Bacillariophyceae). **Water Air Soil Poll** 6: 25-31. 1976.

WOELKERLING, W. An Introduction. In: COLE, K. M.; SHEATH, R. G. **Biology of the red algae**. Cambridge: Cambridge University Press, 528p. 1990.

WYNNE, M. J. A checklist of benthic marine algae of the tropical and subtropical western Atlantic: second revision. Berlin-Stuttgart: **Nova Hedwigia**, 2005.

YRUELA, I. Copper in plants. **Braz J Plant Physiol** 17: 145–146. 2005.

ZACARIAS, A. A.; MORESCO, H. H.; HORST, H.; BRIGHENTE, I. M. C.; MARQUES, M. C. A.; PIZZOLLATI, M. G. Determinação do teor de fenólicos e flavonóides no extrato e frações de *Tabebuia heptaphylla*. In: **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Santa Maria, Rio Grande do Sul. 2007.

ZUBER, H. Structure of light harvesting antenna complex of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae. **Journal Trends Biochemical Sciences**, 11: p. 414-419. 1986.